Best Available Copy

(19) RU (11) 2 105 064 (13) C1

(51) МПК⁶ C 12 N 15/00, 15/70

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96114482/13, 19.07.1996

(46) Дата публикации: 20.02.1998

(56) Ссылки: Рекламный анонс фирмы INVITROGEN, Biotechniques, EURO-EDITION, Jan/Feb. 1996, p.4.

(71) Заявитель:
Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта РАН

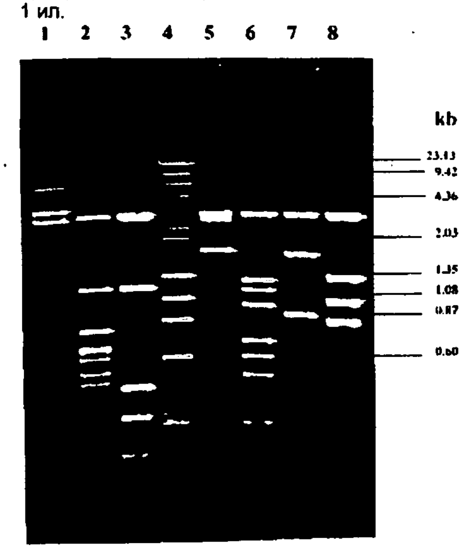
(72) Изобретатель: Деев С.М., Язынин С.А.

(73) Патентообладатель:
Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта РАН

(54) ВЕКТОР PMT440 С ПОЗИТИВНОЙ СЕЛЕКЦИЕЙ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

(57) Реферат:

Вектор pMT440 предназначен для использования в генной инженерии для позитивного селективного клонирования фрагментов чужеродной ДНК. Вектор содержит структурный ген барназы, субклонированный из Bacillus amyloliguefaciens под контролем синтетического tac промотора, универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о., встроенный в ген барназы вместо валина 36, phoA - сигнальную последовательность Escherichia coli, ген специфического ингибитора барназы - барстара под его собственным промотором, фрагмент плазмиды pUC19, включающий участок начала репликации ori, ген Amp^r. Сайты рестрикции находятся в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК: EcoR1 - 300 п.о., SacI - 306 п.о., KpnI - 312 п.о., SmaI - 316 п. о. , BamHI - 321 п.о., SalI - 333 п.о., PstI - 339 п.о., SphI - 345 п.о., HindIII - 351 п.о. Размер вектора 2936 п.о., емкость - 6 т.п.о. Вектор обеспечивает позитивную селекцию клонируемых фрагментов чужеродной ДНК в различных штаммах E. coli. 1 ил.



RU 2105064 C1

Best Available Copy

(19) RU (11) 2 105 064 (13) C1

(51) Int. Cl.^{6} C 12 N 15/00, 15/70

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 96114482/13, 19.07.1996

(46) Date of publication: 20.02.1998

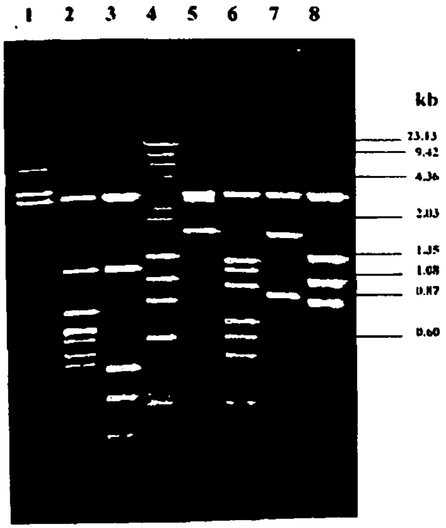
(71) Applicant:
Institut molekuljarnoj biologii
im.V.A.Ehngel'gardta RAN

(72) Inventor: Deev S.M.,
Jazynin S.A.

(73) Proprietor:
Institut molekuljarnoj biologii
im.V.A.Ehngel'gardta RAN

(54) VECTOR PMT440 AT POSITIVE SELECTION FOR FOREIGN DNA FRAGMENTS CLONING

(57) Abstract:
FIELD: molecular biology, genetic engineering. SUBSTANCE: vector has barnase structural gene subcloned from Bacillus amyloliquefaciens under control of synthetic tac-promoter; universal polylinker of plasmid pHC19 consisting of 45 b. p. inserted in barnase gene instead of valine-36; phoA-signal sequence from Escherichia coli; gene of specific barnase inhibitor - barstar under its own promoter; plasmid pHC19 fragment including replication start site ori, gene A_{mp} r.. Restriction sites are located at the following positions from replication start point of plasmid DNA, b. p.: Eco RI 300; SacI 306; KpuI 312; SmaI 316; Bam HI 321; SalI 333; PstI 339; SphI 345, and HindIII 351. Vector size is 2936 b. p., its capacity is 6 t.b.p. Vector provides positive selection of cloning fragments of foreign DNA in different strains of E. coli. EFFECT: improved method of selection. 1 dwg



Изобретение относится к биотехнологии, в частности в генетической инженерии, и представляет собой вектор pMT440, который найдет применение для клонирования фрагментов чужеродной ДНК.

В настоящее время для клонирования чужеродной ДНК и идентификации или отбора клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды, существует целый ряд плазмидных векторных систем. Наиболее известные из них - это системы с использованием комплементации β-галактозидазы с цветовой идентификацией клонов со вставкой [1], нокаут гена устойчивости к антибиотику для негативной селекции [1] . Известно о применении токсинов плазмид ColE1 [2] и ColE3 [3] для непосредственного отбора клонируемых вставок, но эта система ограничена небольшим количеством участков узнавания рестриктаз и не получила широкого распространения.

Известна система, основанная на использовании E-гена лизиса фага φX174 [4]. В последней публикации [5] сообщается о замене этого гена на модифицированный ген, содержащий 10 удобных участков узнавания рестриктаз, не изменяющих его аминокислотную последовательность, что скорректировало прежний довольно высокий уровень фона клонов без вставки.

Известен вектор с позитивной селекцией pKIL18/19, содержащий активный цитотоксический ген ccdD под контролем lac промотора [6]. Продукт этого гена - белок CcdD - инактивирует гиразу в $gyrA^+$ штаммах E.coli. Но вставка чужеродной ДНК нарушает летальное воздействие гена ccdB. Причем сам вектор может быть амплифицирован только в штамме TOP10F, содержащем gyrA462 мутацию по гену гиразы.

Известен вектор pZEro™, сконструированный на основе pKIL18 [7], при этом он содержит протяженный полилинкер для вставок по ccdB гену, T7 и SP6 промоторы, прямой и обратный участки M13, ориджины фага f1 и плазмиды pUC, ген устойчивости к зеоцину. Размер плазмиды снижен до 2,8 т.п.н.

Однако указанный вектор имеет ряд недостатков, а именно он может быть амплифицирован только в одном определенном штамме и характеризуется завышенным количеством баластных клонов за счет того, что полилинкер расположен перед летальным геном, а не внутри него.

В основу изобретения положена задача обеспечения высокоэффективной позитивной селекции клонируемых фрагментов чужеродной ДНК в различных штаммах E. coli.

Задача решена тем, что предложено использовать токсический эффект экспрессии в E. coli гена бактериальной рибонуклеазы из Bacillus amyloliquefaciens - барназы, в векторной системе с позитивной селекцией, содержащей полный мультирестрикционный полилинкер плазмиды pUC19, помещенный внутрь гена барназы без нарушения ферментативной активности экспрессируемого фермента.

Изобретением предлагается вектор pMT440, сконструированный на основе известной плазмиды pMT416, предназначенной для экспрессии высокоактивной рибонуклеазы-барназы, в которой направленно произведены следующие изменения: а) уничтожены внутренние участки узнавания рестриктазами EcoRI, HindIII, XbaI, PstI, BamHI и б) внутрь гена барназы вместо валина 36 встроен универсальный полилинкер от плазмиды pUC19.

Вектор pMT440 с позитивной селекцией для клонирования фрагментов чужеродной ДНК размером 2936 п.о. содержит

структурный ген барназы, субклонированный из Bacillus amyloliquefaciens под контролем синтетического tac промотора;

универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о., встроенный в ген барназы вместо валина 36;

phoA - сигнальную последовательность E. coli, которая обеспечивает секрецию барназы в периплазму бактериальной клетки;

ген специфического ингибитора барназы - барстара, под его собственным промотором;

фрагмент плазмиды pUC19, включающий участок начала репликации ori;

ген Amp^r, определяющий устойчивость к ампициллину в клетках E. coli;

сайты рестрикции в векторе pMT440 находятся в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК:

EcoR1 - 300 п.о.
SacI - 306 п.о.
KpnI - 312 п.о.
SmaI - 316 п.о.
BamHI - 321 п.о.
SalI - 333 п.о.
PstI - 339 п.о.
SpHI - 345 п.о.
HindIII - 351 п.о.;

встраивание чужеродных генов может проходить по сайтам рестрикции, содержащимся в полилинкере;

емкость встраиваемой ДНК - 6 т.п.о.

Экспрессия гена барстар, субклонированного в виде тандема с геном барназы в одной плазмиде, необходима для нейтрализации летального эффекта синтеза барназы. Без индукции в штаммах E. coli, несущих $lacI^Q$ ген для суперэкспрессии lac репрессора (например JM107, XL1-blue, SURE), плазмида не является летальной, хотя секретируются значительные количества барназы. Добавление небольших количеств индуктора IPTG увеличивает секрецию барназы, но полная индукция большими количествами индуктора подавляет защиту барстара, и клетки погибают. В таких штаммах E. coli, как HB101, без $lacI^Q$ гена и в отсутствии индуктора плазмида летальна. В ген барназы вместо кодона валин 36 встроен полилинкер плазмиды pUC19. Эта вставка 19 сильногидрофобных аминокислот в молекулу фермента не нарушает летального воздействия полностью экспрессируемого гена. Полученная в результате плазмида pMT440 является удобным селективным вектором клонирования. Интактная либо слигировавшая на себя pMT440 не поддерживает рост трансформированных $lacI^Q$-негативных штаммов, в то время как бактерии, трансформированные плазмидой со вставкой, выживают.

Вектор PMT440 создан на основе экспрессионной плазмы pMT416. Для этого:

из нее удаляют 5 уникальных участков узнавания рестриктаз (EcoRI, BamHI, XbaI, PstI и HindIII) с помощью разрезания, достраивания концов, лигирования и субклонирования, как описано в [1];

вместо GTG кодона аминокислоты валин 36 с помощью сайт-направленного мутагенеза вставляют последовательность GAATTCCAGTCAAAGCTT, кодирующую аминокислоты Glu-Phe-Gln-Ser-Lys-Leu и содержащую участки узнавания рестриктаз EcoRI (GAATTC) и HindIII (AAGCTT), разделенные спейсером из шести азотистых оснований;

шестичленный участок между EcoRI и HindIII замещают на полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 нуклеотидных оснований. В полученной в результате этого плазмиде pMT440 ген барназы кодирует 19 добавочных аминокислотных остатков вместо одного остатка валин-36. 19 дополнительных аминокислотных остатков, расположенных достаточно далеко от активного центра молекулы и в большинстве своем гидрофобных, образуют внешнюю петлю, не нарушающую нативной конформации фермента;

последовательность структурного гена барназы со вставкой проверяют секвенированием по Сенгеру [8].

Пример 1. Вектор pMT440 в качестве вектора клонирования с позитивной селекцией.

Получают библиотеку случайных Sau3A фрагментов для последующей вставки по участку узнавания BamHI, расположенному в полилинкере. С целью ужесточить условия проверки берут молярные количества плазмидного вектора, в 5 - 10 раз превышающие соответствующие количества фрагментов библиотеки. Такие соотношения также должны были уменьшить вероятность мультимерных вставок. Для клонирования используют две фракции фрагментов: размером приблизительно от 600 до 1200 пар оснований и размером от 2000 до 4000 п.о. После лигирования и трансформации электропорацией в E. coli получают около 600 колоний в случае меньших вставок и 40 колоний с большими на 100 нг вектора. Проверка гибридизацией на чашках с ^{32}P меченым олигонуклеотидным зондом показывает, что 97% клонов не содержат восстановленного участка BamHI в полилинкере. Плазмиды, выделенные из 7 клонов, негативных в гибридизационном тесте, все содержат вставки, что подтверждено результатами обработки их рестриктазами (чертеж).

На чертеже приведены результаты электрофореза в 1% агарозном геле плазмид, обработанных рестриктазами EcoRI и HindIII, выделенных из выживших трансформантов штамма E. coli HB101.

Плазмидная библиотека генов B. amiloliquefaciens была получена лигированием плазмиды pMT440, обработанной BamHI, и фрагментов геномной ДНК B. amiloliquefaciens, обработанной Sau3A. Набор фрагментов был получен объединением фракций, содержащих фрагменты размером приблизительно от 2 до 4 т.п.н., взятых от четырех образцов ДНК, отличающихся различной длительностью обработки рестриктазой Sau3A. В качестве стандарта (четвертая дорожка) использовано по 200 пкг ДНК флага λ, обработанный HindIII и ДНК фага φX174, обработанной HaeIII. Фрагмент векторной ДНК размером 2919 т.п.н. представлен во всех треках. Субклонированные фрагменты содержат от 0 до 9 участков расщепления EcoRI вместе с HindIII.

Источники информации

1. Maniatis, T. , Fritsch, E. F. , Sambrook, J. Molecular cloning (laboratory manual). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

2. Ozaki, L. S., Maeda, S., Shimada, K. and Takagi, Y.: A novel ColEI:: Tn3 plasmid vector that allows direct selection of hybrid clones in E. coli. Gene 8 (1980) 301 - 314.

3. Vernet T. , Lau P.C., Narang S.A. and Visentin. A direct-selection vector derived from pColE3-CA38 and adapted for foreign gene expression. Gene 34. (1985) 87 - 93.

4. Henrich B and Plapp R. Use of the lysis gene of bacteriophage φX174 for construction of a positive selection vector. Gene 42 (1986), 345 -349.

5. Henrich, B., Schmidtberger, B. Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of (φX174 phage gene E. Gene 154 (1995) 51 - 54.

6. Bernard P., Gabant P., Bahassi E.M. and Couturier M. Positive-selection vectors using F plasmid ccdB killer gene. Gene (1994) 71 - 74.

7. Рекламный анонс фирмы INVITROGEN, Biotechniques, EURO-EDITION, Jan/Feb 1996, p. 4.

8. Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

Формула изобретения:

Вектор pMT440 с позитивной селекцией для клонирования фрагментов чужеродной ДНК размером 2936 п.о. содержащий: структурный ген барназы, субклонированный из Bacillus amyloliquetaciens под контролем синтетического tac промотора; универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о. встроенный в ген барназы вместо Валина 36; pho A сигнальную последовательность Escherichia coli, которая обеспечивает секрецию барназы в периплазму бактериальной клетки; ген специфического ингибитора барназы-барстара, под его собственным промотором; фрагмент плазмиды pVC19, включающий участок начала репликации ori; ген Amp^r, определяющий устойчивость к ампициллину в клетках E.coli; сайты рестрикции находятся в полилинкере в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК:

EcoRI 300 п.о.
Sac I 306 п.о.
Kpn I 312 п.о
Sma I 316 п.о
BamH I 321 п.о
Sal I 333 п.о
Pst I 339 п.о
Sph I 345 п.о
Hind III 351 п.о

встраивание чужеродных генов может проходить по сайтам рестрикции, содержащихся в полилинкере; емкость встраиваемой ДНК 6 п.о.